Aus dem Robert Koch Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. H. Raettig

ANTIKÖRPERBILDUNG NACH INTRANASALER APPLIKATION VON ABGETÖTETEM TOXOPLASMA–ANTIGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henny Schulte
aus Berlin

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0055

Aus dem Robert Koch Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. H. Raettig

ANTIKÖRPERBILDUNG NACH INTRANASALER APPLIKATION VON ABGETÖTETEM TOXOPLASMA-ANTIGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henny Schulte
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Volker Lenk

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8. Januar 1974

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 4

II. MATERIAL UND METHODEN 10

III. ERGEBNISSE 15

IV. DISKUSSION 22

V. ZUSAMMENFASSUNG 35

VI. SCHRIFTTUM 36

I. EINLEITUNG

Große Teile der Bevölkerung weisen Antikörper gegen Toxoplasmen auf, die sich serologisch und durch einen Intrakutantest, ähnlich dem Tuberkulintest, nachweisen lassen. 60 % der mitteleuropäischen Bevölkerung sind nach WERNER und JANITSCHKE (46) Antikörperträger. Unterscheidet man nach Altersgruppen, nimmt ihr Prozentsatz mit steigendem Alter zu. JIROVEC (17) gibt für die CSSR 51 - 56 % der über 30jährigen als IDT-positiv (Intradermaltest) an. Nach Untersuchungen von OCKLITZ, GRULICH und KLIMT (27) sind in der Umgebung von Berlin schon die 17- bis 19jährigen in diesem Prozentsatz positiv. In älteren Arbeiten berichten ROTH und FRITZ (39) von etwa 45 % der über 30jährigen in der Schweiz, und KUDICKE und PÖHLIG (24) in Hannover von 70 bis 90 % in der gleichen Altersgruppe.

Wie kommt es zu dieser, in der Literatur unterschiedlich angegebenen, allgemein aber hohen Zahl der Antikörperträger? Haben sie sich alle mit dem lebenden Organismus Toxoplasma gondii auseinandergesetzt, oder stellen die niedrigen, über lange Zeit konstanten Antikörpertiter eine Reaktion auf totes Toxoplasma-Antigen dar?

Über Infektionsmöglichkeiten ist bisher folgendes bekannt: Seit 1939 ist der diaplacenta-

re Infektionsweg bekannt (49), der jedoch epidemiologisch ganz geringe Bedeutung hat. Nachdem HUTCHINSON (14) 1965 eine sogenannte "faecal form" des Parasiten Toxoplasma gondii im Kot der Katze im Zusammenhang mit einer Wurminfektion gefunden hatte, konnte 1970 von verschiedenen Arbeitsgruppen gleichzeitig der Entwicklungszyklus der Parasiten beschrieben werden, womit auch seine Klassifizierung im Tierreich möglich wurde, die vorher noch strittig war (28).

Toxoplasma gondii wird heute unter den Protozoa dem Stamm der Sporozoa zugeordnet, die sich durch einen Generationswechsel in ihrem Entwicklungsgang auszeichnen. Die geschlechtliche Vermehrung findet nach oraler Infektion im Dünndarmepithel der Katze bzw. der Feliden statt; d. h. es bilden sich Gamonten, die zu Gameten reifen, und nach Befruchtung Oozysten, die mit dem Kot ausgeschieden werden. Parallel dazu findet im Katzendarm auch ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) statt. Die Oozysten sind zunächst nicht infektiös, sondern werden dies erst nach der Sporulation, die etwa 2 - 3 Tage nach der Ausscheidung abgeschlossen ist, wenn Wärme, Feuchtigkeit und Luft vorhanden sind.

Wenn die Oozysten nun von anderen Säugetieren oder Vögeln aufgenommen werden, vermehren sich die Parasiten ungeschlechtlich in diesen Zwischenwirten und bilden schließlich

Zysten, die bis zum Tode des Wirtes lebende Toxoplasmen enthalten, so daß sich Katzen infizieren können und der Zyklus von neuem beginnt, oder in anderen Carnivoren sich eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung anschließt.

Daraus lassen sich nun folgende Möglichkeiten der postnatalen Infektion ableiten:

1. Genuß von rohem Fleisch, das Toxoplasma-Zysten enthält (freie Toxoplasmen, d. h. Trophozoite, werden im Magen zerstört). Hier kommt in erster Linie "Hackepeter" und ungenügend gebratenes oder gekochtes Schweine- oder Hammelfleisch in Frage, da bei diesen Spezies in 10 bis 12 % Toxoplasmen nachgewiesen werden konnten (46).

2. Orale Aufnahme der Oozysten mit verunreinigter pflanzlicher Nahrung.

3. Schmier- und Tröpfcheninfektion beim Umgang mit infektiösem Material, z. B. beim Schlachten infizierter Tiere, im Labor und bei engem Kontakt mit akut an Toxoplasmose erkrankten Tieren, da diese die Parasiten in Sputum, Speichel, Fäces, Urin, Samenflüssigkeit und Milch ausscheiden können.

Wenn man bedenkt, daß die Toxoplasma-Oozyste, die die Dauerform des Parasiten darstellt, jahrelang infektiös bleiben kann und sogar von den meisten Desinfektionsmitteln nicht oder erst nach langer Zeit abgetötet wird, könnte man hier die Hauptinfektionsquelle für die Durchschnittsbevölkerung vermuten. Die Lebensfähigkeit der Oozyste ist aber an das feuchte Milieu gebunden, was ebenso wie die Tatsache, daß eine Katze in der Regel nur bei Erstinfektion, d. h. einmal in ihrem Leben, für etwa 3 Wochen Oozysten ausscheidet, die wiederum erst nach 2 - 3 Tagen unter bestimmten Bedingungen ihre Infektiosität erlangen, die epidemiologische Bedeutung dieses Übertragungsweges wieder erheblich einschränkt, zumal die Katzen ihren Kot verscharren. So scheint für den Menschen der Genuß rohen Fleisches die Hauptinfektionsquelle darzustellen. Jedoch lehnen viele Menschen rohes Fleisch ab und auch bei Vegetariern ließen sich Toxoplasma-Antikörper nachweisen. Außerdem läßt sich auch die große Zahl der Antikörperträger unter Kaninchen und Schafen so nicht erklären. Durch die verschiedenen Infektionsmöglichkeiten sind also die meisten Antikörperträger unter Menschen und Tieren nicht erklärt.

In Untersuchungen zur lokalen Immunisierung wird grundsätzlich eine andere Erklärungsmöglichkeit aufgezeigt: Schon IBRAHIM (15) fand, auf der Suche nach neuen Anwendungsformen für

Impfstoffe, daß die intranasale Verabreichung einer Abschwemmung von abgetöteten Typhusbakterienkulturen zu guter Antikörperbildung führt, jedoch geringere Titeranstiege als bei subkutaner Immunisierung erreicht werden. RAETTIG und BUSE (62) konnten bei Mäusen Hämagglutinationstiter-Anstiege nach oraler Impfung mit S.typhi murium nachweisen. Die Titerhöhe war im Vergleich zur subkutanen Impfung ebenfalls wesentlich geringer. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde gezeigt, daß nach lokaler Immunisierung nicht nur ein guter Krankheitsschutz erreicht wird, wie schon vorher bewiesen war, sondern auch eine allgemeine Immunreaktion des Makroorganismus eintritt, die sich in der Bildung humoraler Antikörper ausdrückt. Die Frage ist, inwieweit ein Antikörpertiter beweisend für eine Infektion ist und nicht auch auf Kontakt mit totem Antigen zurückgeführt werden kann.

So wird in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob die Antikörperbildung gegen Toxoplasmen auf die Aufnahme toten Antigens zurückgeführt werden könnte, zumal gerade bei der Toxoplasmose eine Diskrepanz besteht zwischen der geringen Zahl klinischer Erkrankungen und der großen Zahl der Antikörperträger gegen den ubiquitären Parasiten. Wir verabreichten intranasal, d. h. also auf einem Wege, der dem natürlichen entsprechen könnte, abgetötetes Toxoplasma-Antigen. Außerdem erwies sich die intra-

nasale Immunisierung bei SCHWARTZE (41) und anderen Autoren der oralen ebenbürtig. Unter den Toxoplasmoseforschern hob KASS (18) schon 1952 den intranasalen Infektionsweg hervor und diskutierte seine epidemiologische Bedeutung.

II. MATERIAL UND METHODEN

Versuchstiere

Für den Vorversuch standen 6 junge Mischrassekaninchen zur Verfügung, die zu Beginn der Immunisierung 1900 bis 2250 g schwer und seronegativ waren.

Im Hauptversuch wurden zwei Gruppen von Kaninchen verwendet:

Gruppe A umfaßte 11 Tiere, die vor dem Experiment im Sabin-Feldman-Test (SFT) nicht eindeutig negativ reagierten und teilweise Titer bis 1 : 4 aufwiesen, was aber als unspezifische Reaktion aufgefaßt werden kann, zumal diese Tiere im Experiment nicht anders als die Gruppe B reagierten. Die Gewichte der A-Tiere lagen zwischen 2650 und 2850 g, durchschnittlich bei 3440 g. Sie wurden einzeln in Käfigen gehalten, auf Heu oder Sägemehl und bekamen Trockenfutter und Wasser ad libitum.

Gruppe B bestand aus 8 Tieren der Rasse "Sandy-Lop" mit Körpergewichten zwischen 2470 und 2860 g, durchschnittlich 2580 g. Diese Kaninchen waren serologisch eindeutig negativ. Sie wurden einzeln in Metallkäfigen auf Rosten (Modell Fluppins) gehalten und mit Trockenfutter und Wasser ernährt.

Alle Tiere entstammen der "Zentralen Versuchstieranlage des Bundesgesundheitsamtes" (Dir.: Prof. Dr. Wellmann).

Immunisierung

In Vor- und Hauptversuch wurde zweimal fünf Tage lang - dazwischen zwei Tage Pause - immunisiert. Die tägliche Dosis pro Kaninchen betrug in der ersten Woche 0,4 ml und in der zweiten Woche 0,5 ml Antigen.

Mit einer Eppendorf-Pipette wurde den in Rükkenlage gehaltenen Kaninchen die vorgesehene Menge Antigen in beide Nasenlöcher geträufelt. Im Hauptversuch wurde steril gearbeitet. Dabei war es den Tieren auch möglich, das Antigen zu verschlucken, wie es auch SCHMUDDE (41) beschrieb, so daß nicht genau gesagt werden kann, wieviel Antigen aus den Luftwegen und wieviel aus dem Verdauungstrakt resorbiert wurde. Somit ist bei unserer Technik keine scharfe Trennung zwischen intranasaler und oraler Immunisierung möglich. Die intraperitoneale Immunisierung wurde im gleichen Zeitraum mit gleichen Dosen per injectionem vorgenommen.

Impfstoff

Es wurde mit Toxoplasma-Antigen immunisiert, das sonst für die KBR verwendet wird.
Im Vorversuch wurde Antigen benutzt, das in der Abteilung für med. Parasitologie des Robert Koch Institutes aus Peritonealexsudat infizierter weißer Mäuse auf folgende Weise hergestellt worden war: 1 g Rohantigen + 10 ml physiolog. Kochsalzlösung mit 0,25 % Phenolzusatz wurden 30 min in der Gewebemühle gemahlen. Danach wurde die Substanz 10 x tiefgefroren und bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde 20 min mit 3000 U und dann 2 Stunden mit 15000 U zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde gefriergetrocknet. Zur Immunisierung wurde das so gewonnene lyophilisierte Antigen in einer abgestorbene Toxoplasmen enthaltenden NaCl-Lösung aufgelöst.

Im Hauptversuch wurde lyophilisiertes Standard-Antigen aus dem Institut für medizinische Parasitologie (Dir.: Prof. Dr. G. Piekarski) der Universität Bonn benutzt, das im Prinzip auf gleiche Weise hergestellt wird. Als Ausgangsmaterial dient jedoch statt Mäuseperitonealexsudat die Chorioallantoismembran infizierter Hühnerembryonen. Zur Kontrolle diente Kontrollantigen aus dem gleichen Gewebe. Zum Gebrauch wurde dieses Standard-Antigen in gepufferter,

physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und 1 : 2,5 verdünnt.

Versuchsanordnung im Hauptversuch

6 Kaninchen der Gruppe A und 6 Kaninchen der Gruppe B wurden intranasal mit Toxoplasma-Standard-Antigen immunisiert. Je 2 Kaninchen der Gruppen A und B dienten als Kontrolltiere und erhielten intranasal Kontroll-Antigen. 3 Kaninchen der Gruppe A wurden intraperitoneal mit Toxoplasma-Standard-Antigen immunisiert.

Sabin-Feldman-Test

Nach Beendigung der Immunisierung wurde den Kaninchen in wöchentlichen und im späteren Verlauf in 14tägigen Abständen Blut aus der Ohrvene entnommen, und das Serum tiefgefroren. Im Hauptversuch wurden die Seren gesammelt und abschließend die verschiedenen Seren jedes Tieres in einem Ansatz im SFT getestet.

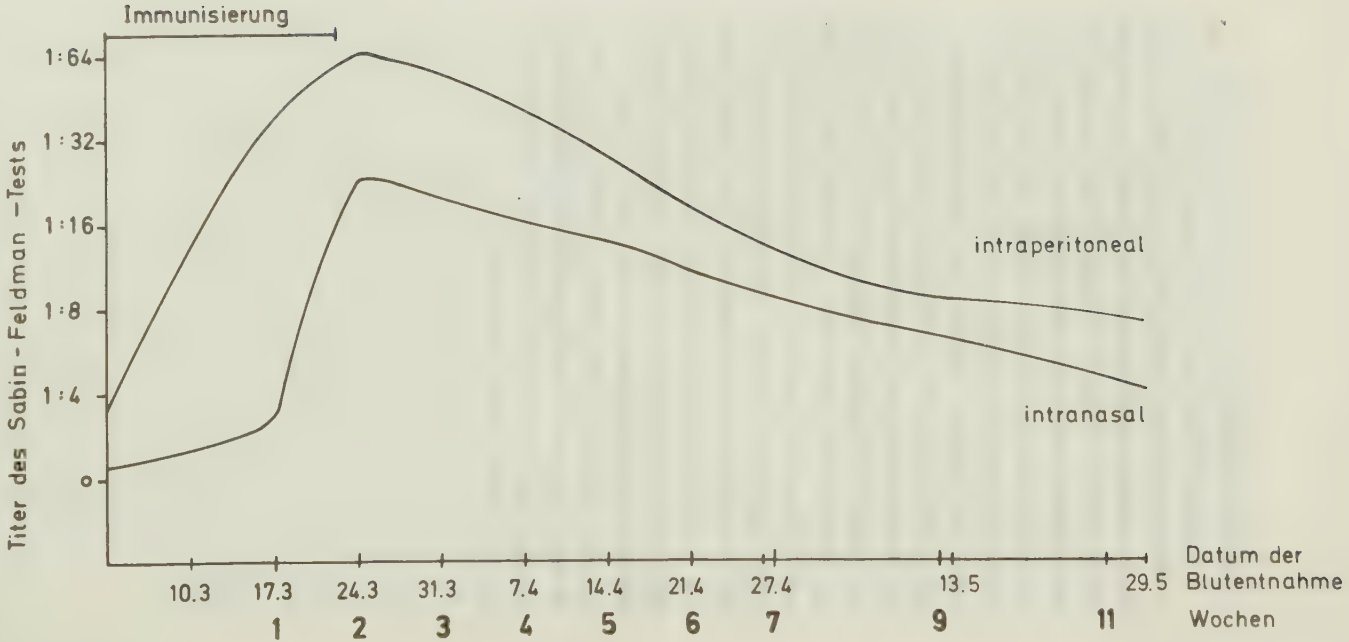
Der SFT wurde nach den im Bundesgesundheitsblatt (50) veröffentlichten Empfehlungen durchgeführt. Nur wurden statt der üblichen Verdünnungen (1 : 4, 1 : 16 usw.) eine einfa-

che Verdünnungsreihe der Seren (1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 usw.) ausgetestet, um den Titerverlauf genauer verfolgen zu können. Im Vorversuch wurde jede Serumprobe am 1. oder 2. Tag nach der Blutentnahme im SFT in den üblichen Verdünnungsstufen getestet.

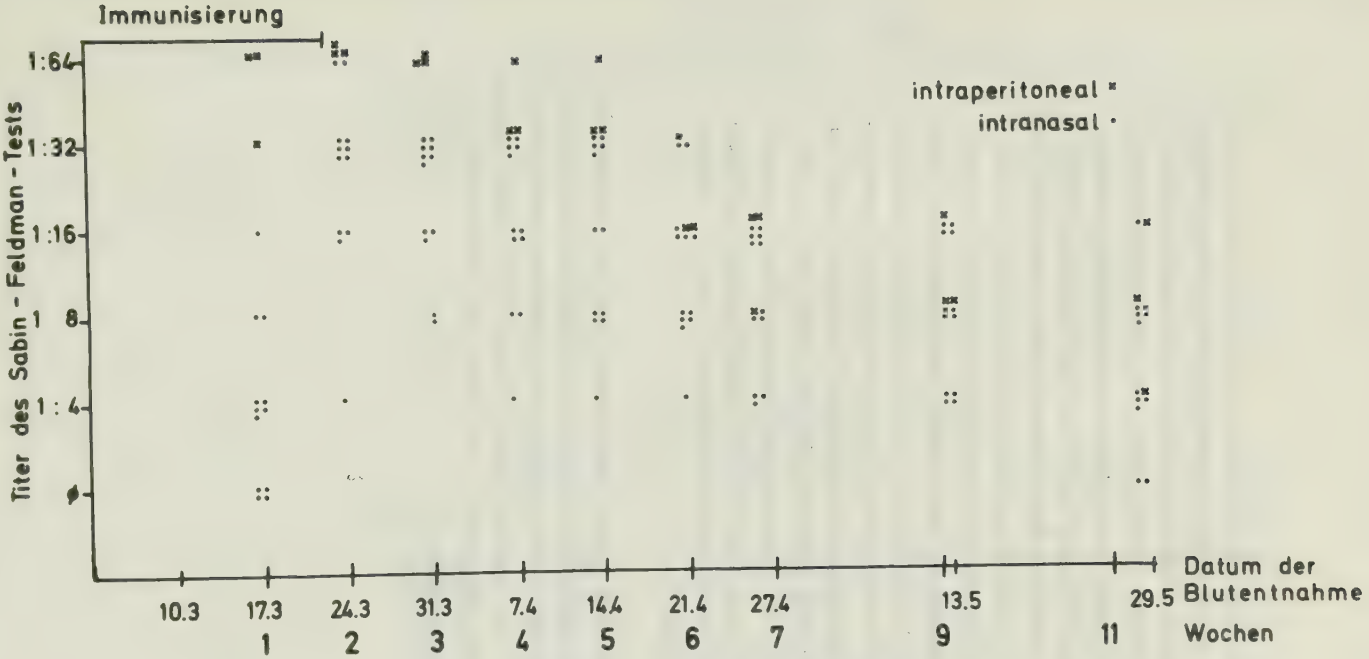
III. ERGEBNISSE

Im Prinzip zeigen alle Tiergruppen der Untersuchung die gleiche Reaktion. Steiler Anstieg der Antikörper-Titer bis zum Maximum, das eine Woche nach Beendigung der Immunisierung erreicht wird. Anschließend geht die Antikörperbildung langsam kontinuierlich zurück, ist aber zehn Wochen später, bei Beendigung der Beobachtung, noch nicht völlig erloschen (Abb. 1). Betrachtet man jedoch die Reaktionen der einzelnen intranasal immunisierten Tiere (Abb. 2, Tabelle 3), sieht man, daß sich bei 2 Tieren in der 11. Woche p. imm. keine Antikörper mehr nachweisen ließen. Zwischen intranasal und intraperitoneal immunisierten Tieren kann man einen Unterschied in der Intensität der Reaktion erkennen. Außerdem liegt der Beginn der Antikörperproduktion bei den intraperitoneal immunisierten Tieren früher, was man an dem steilen Aufstieg der Antikörperkurve ablesen kann (Abb. 1). Außerdem gibt es noch einige auffallende Befunde.

Abb.1



Kinetik der Antikörpertiter des Sabin-Feldman-Tests innerhalb von elf Wochen nach Beendigung einer zweiwöchigen intranasalen Immunisierung von zwölf Kaninchen bzw. intraperitonealen Immunisierung von 3 Kaninchen mit abgetötetem Toxoplasma-Antigen.



Darstellung der an den Tagen der Blutentnahmen gefundenen Antikörpertiter des Sabin-Feldman-Tests jedes einzelnen im Hauptversuch intranasal und intraperitoneal immunisierten Versuchstieres.

Kaninchen 47 erreichte kaum Titer über 1 : 4 und zeigt somit praktisch keine Immunantwort. Eine Erscheinung, die auch im Vorversuch an Kaninchen 33 zu sehen war, bei dem, vermutlich wegen des gröberen serologischen Nachweisverfahrens (größere Verdünnungsstufen), die Reaktion noch undeutlicher war. HULDT (12) beschreibt ebenfalls ein Kaninchen, das nach experimenteller Infektion keinen SFT-Titer entwickelte, dafür aber hohe KBR-Titer, die bei allen anderen Tieren derselben Gruppe nicht nachweisbar waren. Um ein möglicherweise ähnliches Verhalten bei unseren Tieren zu erfassen, prüften wir die Seren auch in der KBR. Leider mußte aber schon im Kontrollansatz eine positive Reaktion festgestellt werden, so daß die Untersuchung nicht zu verwerten war.

Weiterhin fallen Kaninchen 5 und 11 aus dem Rahmen, die erst in der zweiten Woche nach Beendigung der Immunisierung den höchsten Antikörpertiter erreichen. Sonst sind alle Verläufe gleichsinnig und werden gut durch die Summenkurve wiedergegeben.

Tabelle 1

V O R V E R S U C H

Titer im SFT (reziproker Wert der Verdünnung)
Prüfung in den Verdünnungen 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64 usw.

Kaninchen Nr.	0	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12. Woche*)
31	Ø	4	64	16	16								
32	Ø	4	16	4									
33	Ø	Ø	Ø	Ø	4	4	4	Ø	4	4	4	Ø	Ø
35	Ø	4	64	16	16	16	16	4	4	4	4	4	4
36	Ø	4	16										

H A U P T V E R S U C H
intraperitoneale Immunisierung

Titer im SFT (reziproker Wert der Verdünnung)
Prüfung in den Verdünnungen 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 usw.

Kaninchen Nr.	0	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12. Woche*)
53	4	64	64	64	64	64	32	16		16		16	
59	4	32	64	64	32	32	16	16		8		8	
61	4	64	64	64	32	32	16	8		8		4	

*) 0 bezeichnet die serologische Untersuchung vor Beginn des Versuchs, 1 bis 12 die wöchentlichen Blutentnahmen ab Beendigung der Immunisierung, also ab zweiter Woche des Versuchs.

H A U P T V E R S U C H

intranasale Immunisierung

Tabelle 3

Titer im SFT (reziproker Wert der Verdünnung)
Prüfung in den Verdünnungen 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 usw.

	Kaninchen Nr.	0	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12. Woche*)
Gruppe A	37	Ø	Ø	32	8	8	8	8	4		4		Ø	
	38	4	4	32	16	16	16	8	4		4		4	
	44	Ø	8	32	32	16	8	8	8		8		8	
	47	Ø	4	4	8	4	4	4	4		4		4	
	54	4	4	32	32	32	32	32	16		8		8	
	60	Ø	8	64	32	32	32	32	16		16		16	
Gruppe B	4	Ø	16	64	32	32	32	16	16		16		8	
	5	Ø	Ø	16	32	32	32	16	16		8		4	
	8	Ø	Ø	32	16	16	16	16	16		16		8	
	9	Ø	Ø	16	16	16	8	8	8		4		Ø	
	11	Ø	4	16	32	32	32	16	16		16		8	
	12	Ø	4	32	32	8	8	8	8		8		4	

*) 0 bezeichnet die serologische Untersuchung vor Beginn des Versuchs, 1 bis 12 die wöchentlichen Blutentnahmen ab Beendigung der Immunisierung, also ab zweiter Woche des Versuchs.

Die Todesursache zweier während des Vorversuchs verstorbener Tiere (Nr. 32 und 36) konnte nicht geklärt werden. Da jedoch im Hauptversuch alle Tiere ausnahmslos überlebten, und auch keine Krankheitszeichen zeigten, könnten die beiden Kaninchen einem interkurrenten Infekt erlegen sein, zumal die Tiere bei Versuchsbeginn noch sehr klein und zart waren. Kaninchen 31 starb bei der vierten Blutentnahme, ohne vorher krank gewesen zu sein.

IV. DISKUSSION

Unsere eingangs gestellte Frage lautete: Können natürlich vorkommende Antikörper gegen Toxoplasmen auf Kontakt mit inaktiviertem Antigen zurückzuführen sein?

Mit unserem Experiment haben wir bewiesen, daß ein solches Antigen eine Immunantwort hervorruft. Ihre Stärke entspricht den am häufigsten getroffenen Antikörpertitern klinisch gesunder Tiere, und auch die Titer der Durchschnittsbevölkerung liegen in dieser Größenordnung. Da wir auch mit der intranasalen Verabreichung abgetöteter Toxoplasmen einen natürlichen Weg wählten, kann unser Modell auf die Natur übertragen, und damit obige Frage bejaht werden.

Die Verlaufscharakteristik der Antikörperkurven ist in unseren Versuchen, wie oben gesagt, bei allen Tieren gleich, obwohl im Vorversuch anderes Antigen als im Hauptversuch und im Hauptversuch verschiedene Impfwege zur Anwendung kamen.
Gleiches fanden auch RAETTIG und BUSE, da sie trotz verschiedener Anwendungsarten und -dosen bakteriellen Impfstoffes beim Kaninchen stets die gleiche Immunantwort erhielten (33). Auch zu den Ergebnissen von JANITSCHKE, PICHL und SEEGER (16), die Antikörpertiter gegen Toxoplasmen bei Kaninchen unter verschiedenen Be-

dingungen systematisch untersuchten, zeigen sich Parallelen, obwohl dort nicht immunisiert, sondern infiziert wurde. So fanden die Autoren gleiche Immunantwort bei Verwendung verschiedener Toxoplasma-Stämme und Infektionsdosen. Dem entsprechen bei uns gleiche Ergebnisse trotz unterschiedlicher Antigene in Vor- und Hauptversuch.

Beim Vergleich enteraler und parenteraler Infektionswege stellten JANITSCHKE, PICHL und SEEGER einen verzögerten Anstieg der Antikörper bei oraler Infektion fest, was bei uns ebenfalls zu sehen ist. Im weiteren Verlauf überschneiden sich die Streubereiche der beiden Infektions- bzw. Immunisierungswege (Abb. 2). Die absolute Titerhöhe der Antikörper ist allerdings nicht zu vergleichen, da eine Immunisierung eine geringere Antikörper-Antwort hervorruft als eine Infektion (22).

Wir stimmen aber in diesem Punkt mit STRANNEGARD (42) überein, der Kaninchen oral immunisierte und Titer der gleichen Größenordnung erhielt. Bei Arbeiten mit anderen Versuchsobjekten, z. B. Meerschweinchen (5, 10) Schaf (1) und Mensch (4), wurden jedoch völlig andere Werte durch Immunisierung mit Totimpfstoff erreicht.

Wie auch bei anderen Arbeiten zur lokalen Immunisierung bleiben die Antikörpertiter in der

vorliegenden Arbeit nicht konstant hoch, sondern fallen, wenn auch sehr langsam, wieder ab. Nach experimenteller Infektion mit Toxoplasmen bleiben die Titer jedoch enorm hoch (JANITSCHKE, PICHL und SEEGER (16) überprüften ein Tier sogar bis zum 449. Tag p. inf., ohne eine Minderung der Antikörper feststellen zu können).

Es wird nun durch unsere Ergebnisse gezeigt, daß die niedrigen bis mittleren Titer (1 : 4 bis 1 : 1000), die viele Untersucher (11, 44) bei Kaninchen gefunden haben, nicht als infektionsbedingt angesehen werden müssen, sondern auch als Reaktion auf Antigenkontakt, unserem Modell entsprechend, erklärt werden können.

Die natürlich vorgefundenen Antikörpertiter mittlerer Höhe gegen Toxoplasmen weisen, im Gegensatz zu den Titerverläufen in unseren Versuchen, über längere Zeit konstante Werte auf. Dies könnte für einen flacheren Kurvenverlauf bei einem Antigen anderer Qualität in der Natur oder aber für häufige geringe Stimulation der Antikörperbildung sprechen. Bis heute werden endogene Antigenstimuli, die von Toxoplasma-Zysten ausgehen, für die Aufrechterhaltung der niedrigen Antikörpertiter verantwortlich gemacht (22), d. h. es wird eine Infektion vorausgesetzt. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre es

jedoch denkbar, daß häufig von außen, beispielsweise mit der Nahrung zugeführtes Antigen, diese Antikörperbildung bewirkt.

Hinweise für diese Möglichkeit zeigte schon REMKY (36). Er versuchte, durch Toxoplasmininjektion die körpereigene Abwehr zu stärken und erreichte damit eine Änderung natürlicher, schon vorhandener Antikörpertiter. Auch FAIR (4) induzierte bei Freiwilligen einen Antikörperanstieg durch Injektion abgetöteten Toxoplasma-Antigens.

Diese Arbeiten lassen den Schluß zu, daß häufiger Antigenkontakt zu einer ständigen Antikörperproduktion führen kann, die wir in unserem Versuch durch intranasale Zufuhr abgetöteten Toxoplasma-Antigens zunächst für mehrere Wochen induzieren konnten, da nur eine bestimmte Zeit lang immunisiert wurde.

Interessant für unsere Fragestellung sind auch die Ergebnisse von HULDT (11). Sie infizierte verschiedene Gruppen von Kaninchen: 1) seronegative, 2) seropositive mit hohen Titern nach Immunisierung mit Totimpfstoff, 3) seropositive mit natürlich erworbenen niedrigen Titern, 4) seropositive mit natürlich erworbenen hohen Titern. Die Gruppen 1 - 3 zeigten klinisch die gleichen Krankheitezeichen, nur Gruppe 4 blieb völlig gesund und zeigte sich immun. Das heißt, daß die beiden

Gruppen (3 und 4), die natürlichen Antigenkontakt vor der Infektion gehabt hatten, sich auf unterschiedliche Weise mit dem Erreger auseinandergesetzt hatten und so eine unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber der Toxoplasmose erlangt hatten. Hohe Titer (Gruppe 4) sprechen für durchgemachte Infektion (16), die niedrigen Titer der Gruppe 3 können auf Antigenkontakt, ähnlich unserem Versuch, beruhen.

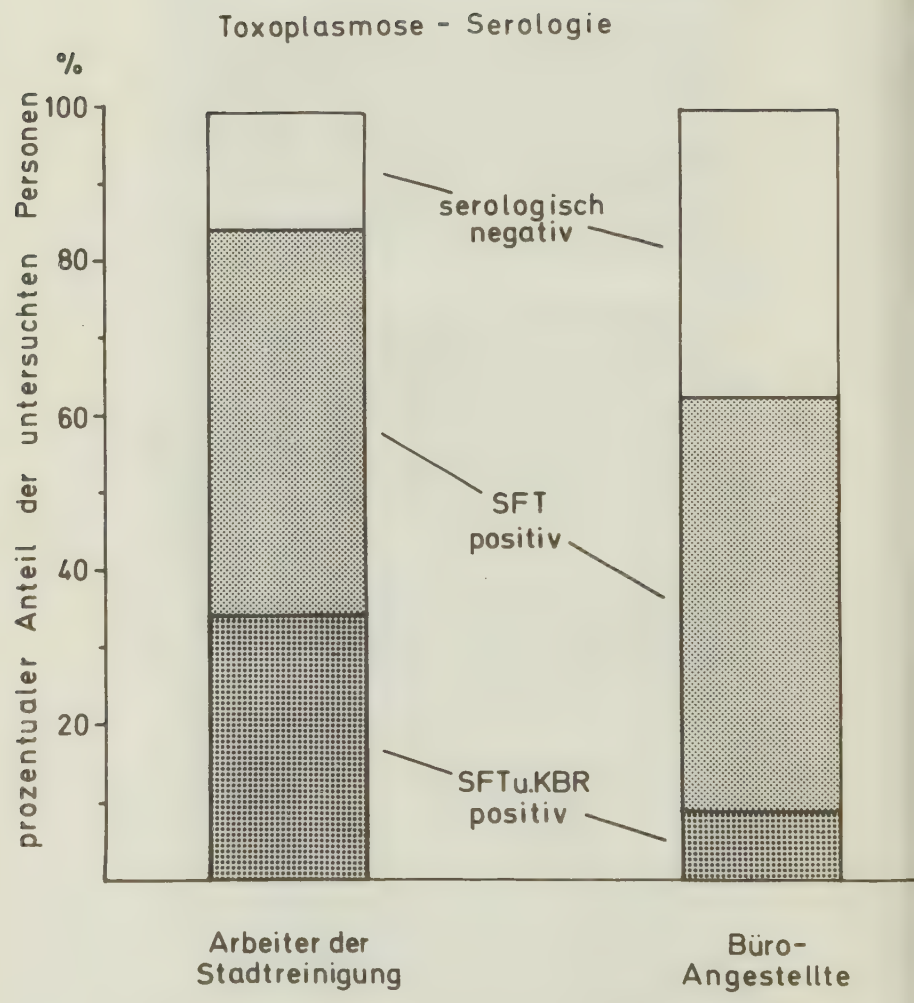
Andererseits konnte WERNER (44) bei Untersuchungen an Kaninchen verschiedener Herkunft zeigen, daß seropositive, klinisch gesunde Tiere ganz unterschiedlicher Titerstufen (1 : 16 bis 1 : 256.000) lebende Toxoplasmen beherbergten, die im Mäuseversuch nachgewiesen wurden.

Weitere interessante Gesichtspunkte bietet die Arbeit von POHL (29). Anhand serologischer Untersuchungen verschiedener Berufsgruppen konnte sie feststellen, daß Straßenkehrer 20 % mehr Antikörperträger aufwiesen als Büroangestellte (Feger 85 von 99, Büroangestellte 62 von 99) bei völliger Gesundheit. Entsprechend der Titerverteilung (Abb. 3) wurden von den Arbeitern 50, von den Angestellten 53 als latent und von den Arbeitern 34 und den Angestellten 9 als manifest infiziert angesehen. Dabei entfiel der Hauptanteil der als manifest infiziert angesehenen

Personen auf die jüngeren, bis zu 40 Jahre alten Probanden.

Da die Häufigkeit der außerberuflichen Tierkontakte bei beiden Personengruppen keinen signifikanten Unterschied erkennen ließ, wurde die stärkere Durchseuchung der Arbeiter der Stadtreinigung auf einen intensiveren Kontakt mit tierischen Exkrementen im Beruf und erhöhte Infektionsgefährdung zurückgeführt.
Heute weiß man aber, daß Hunde, die lange als Hauptinfektionsquelle angesehen wurden, nur selten akut an Toxoplasmose erkranken und niemals lebende Erreger mit ihren Exkrementen ausscheiden, wenn sie oral, d. h. auf natürlichem Wege, infiziert werden (37). Im Zusammenhang mit unserer Arbeit gesehen, könnten die Ergebnisse von POHL (29) durch eine häufigere Kontamination mit Toxoplasma-Antigen bei den Straßenkehrern erklärt werden, wodurch die Antikörperbildung ständig unterhalten würde.

Abb. 3



Gegenüberstellung der bei einer einmaligen Untersuchung an 99 Arbeitern der Stadtreinigung und 99 Büroangestellten von U. POHL erhobenen serologischen Befunde.

Nichtvermehrungsfähiges Antigen ist nicht wie der lebende Parasit an einen Wirtsorganismus gebunden, so daß es sich unter Umständen auch im Straßenschmutz befinden kann. Größere epidemiologische Untersuchungen hierüber sind bisher allerdings noch nicht bekannt.

Es gelang aber RUIZ, FRENKEL und CERDAS (38), Toxoplasmen aus Bodenproben anzuzüchten, die an feuchten, vor Sonne geschützten Stellen entnommen worden waren, in einer Gegend, in der besonders viele Katzen lebten. Eine offensichtliche Vermischung mit Katzenkot bestand bei dem Untersuchungsmaterial jedoch nicht. Bei Untersuchungen in der Trockenzeit, als der Boden vollkommen ausgetrocknet war, konnten keine lebenden Parasiten mehr im Schmutz nachgewiesen werden. Wahrscheinlich führte die Trockenheit zum Absterben der Toxoplasmen, jedoch erscheint es durchaus möglich, daß sich das Antigen noch in den Bodenproben befand, aber nicht nachgewiesen wurde. Denn mit den üblichen Tierversuchen, mit denen Untersuchungsmaterial auf Toxoplasmen geprüft wird, kann nichtvermehrungsfähiges, z. B. abgestorbenes Toxoplasma-Antigen nicht ohne weiteres nachgewiesen werden, da es bei einmaliger bzw. kurzzeitiger Zufuhr nur für bestimmte Zeit und in geringer Menge Antikörperbildung im Versuchstier bewirkt und nie zur Zystenbildung führt.

Ungeklärt bleibt, wie Antigen z. B. in den Straßenschmutz gelangt. Es könnte parasiten-

haltiger Katzenkot die Antigenquelle sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß infizierte Tiere Antigen mit dem Kot ausscheiden. Stets hat man sich nur darum bemüht, lebende Toxoplasmen in Exkrementen nachzuweisen.

Eine andere Erklärung für die Aufnahme von nicht mehr vermehrungsfähigem Antigen und einer dadurch bedingten Titerbildung bietet die Möglichkeit, daß in gekochtem und gepökeltem Fleisch, Fleischkonserven und Wurstwaren abgestorbene Toxoplasmen vorkommen, die oral aufgenommen werden.

Es sollte in der vorliegenden Arbeit lediglich untersucht werden, ob eine Antikörperbildung auch auf intranasalem Weg durch abgestorbenes Antigen induziert werden kann, da wir vermuten können, daß nicht vermehrungsfähige Toxoplasmen auch außerhalb eines lebenden Organismus in der Natur vorkommen. Im einzelnen ist dies jedoch noch nicht geklärt.

Zwar sollten in dieser Arbeit nicht primär Ergebnisse über Immunisierung als Krankheitsschutz erzielt werden, da jedoch intranasal Antigen angewendet wurde, also eine Form der lokalen Immunisierung, soll dies in Beziehung zu den bisherigen Immunisierungsversuchen gegen Toxoplasmose gestellt werden.

Es gibt bisher keine wirksame Impfung gegen Toxoplasmose, obwohl in dieser Richtung bereits viel geforscht wurde. Nur eine Prämunität scheint gegen eine Toxoplasmose, d. h. eine Erkrankung infolge einer Reinfektion oder eines Rezidivs, ausreichend zu schützen (1, 8, 19, 22, 25, 43). Das mag durch die variable und komplexe Struktur des Antigens bei Protozoen bedingt sein (26). Eine Antigenspezifität ist bei dieser Parasitengruppe schwer zu erreichen. Auf ihr beruht jedoch die Wirksamkeit der parenteralen Impfung.

Außerdem scheint auch die Bedeutung der spezifischen, humoralen Antikörper allein für den Krankheitsschutz nicht groß zu sein, was Studien über passive Immunisierung zeigten (5, 6, 48). Dies wird auch durch in vitro Untersuchungen unterstützt; denn sowohl durch Immunisierung als auch durch Infektion erworbene Antikörper zeigen auf der Gewebekultur die gleiche toxoplasmazide Wirksamkeit, obwohl geimpfte Tiere wesentlich weniger resistent sind als infizierte. Die unterschiedliche Resistenz der Tiere beruht also nicht auf unterschiedlich wirksamen humoralen Antikörpern, sondern ist noch durch andere Mechanismen bedingt (13).

Nach COLLINS (2) ist die Wirkung der humoralen Antikörper allgemein so zu erklären: Antikörper allein schützen dadurch, daß sie die Verbreitung und Vermehrung der Mikroorganismen ver-

langsamen, sie aber nicht ganz verhindern. Durch diesen Zeitgewinn kann der Wirt, wenn die Invasion nicht zu stark ist, seine zelluläre Immunität entwickeln, ohne von den pathogenen Keimen überschwemmt zu werden. KRAHLENBUL, RUSKIN und REMINGTON (23) bestätigen dies für Toxoplasma-Antikörper. Sie konnten ihre schützende Wirkung nachweisen, jedoch erst bei geringen, für Kontrolltiere aber noch letalen Infektionsdosen.

So wird der zellulären Immunität eine größere Bedeutung in der Infektionsabwehr beigemessen. FRENKEL (6) konnte durch Übertragung von Immunzellen mit Toxoplasmen infizierter Spender beim Empfänger Krankheitsschutz erreichen und KORNILOVA und KORNILOVA (21) wiesen bei immunen Tieren größere Phagozytoseaktivität als Ausdruck der zellulären Immunität nach.

Mit der klassischen parenteralen Impfung gegen Toxoplasmose konnte bis jetzt kein praktisch ausreichender Erfolg erzielt werden, obwohl auch ihre Wirksamkeit nachgewiesen wurde (1, 3, 23). Diese war dann immer abhängig von der Höhe der humoralen Antikörpertiter, was nach obigen Ausführungen zu verstehen ist. Gegen stärker virulente Infektionen erwies sie sich stets als unwirksam.

Die im Sinne einer Prämunität wirksame Lebendimpfung wird ebenfalls abgelehnt, da sie wegen

möglicher Virulenzänderung der benutzten Toxoplasmastämme und unterschiedlicher Abwehrkraft der Impflinge zu gefährlich ist, wenn auch durch gleichbleibende Passagebedingungen über einige Jahre hinweg eine konstante Virulenz von Toxoplasmastämmen erreicht werden konnte (45). Auch wäre eine Exazerbation der latenten Infektion bei einer im späteren Leben auftretenden Abwehrschwäche des Makroorganismus nicht auszuschließen.

RAETTIG und Mitarbeiter zeigten nun in jahrzehntelanger Forschungsarbeit die gute Wirksamkeit oraler Impfung im Tierexperiment und in großen Feldversuchen und untermauerten diese Ergebnisse durch die Untersuchung der Antikörperbildung sowie der Persorptions- und Sekretionskinetik des Antigens im Makroorganismus (30, 31).

Die lokale Impfmethode zeigte sich nicht nur gegen Bakterien und Viren, sondern auch gegen Candida albicans (7) und in gewisser Weise auch gegen Tuberkelbakterien (47) wirksam, also gerade auch gegen Erreger granulomatöser Entzündungen, für die das zelluläre Immunsystem von besonderer Bedeutung ist (9).

In Untersuchungen über unspezifischen Impfschutz (20) und die Wirkung von Kombinationsimpstoffen (34) konnte bei gleichem, oralem Immunisierungs- und Infektionsweg auch für Salmonellen verschiedener Struktur ein Impfschutz erreicht werden.

REMINGTON (35) vermutet gleichartige Immunabwehr gegen intrazellulär lebende Mikroorganismen, zu denen auch Salmonellen und Toxoplasmen gehören. Er zeigte, daß mit Toxoplasmen infizierte Mäuse gegen die fakultativ intrazellulären Bakterien Listeria monozytogenes und Salmonella typhi murium resistent sind, und weiter, daß mit Besnoitia jellisoni infizierte Mäuse gegen intrazellulär lebende Bakterien, Parasiten und das Mengo-Virus geschützt sind, daß sich der Schutz also auch auf phylogenetisch nicht verwandte Arten erstreckt. Unter gewissen Bedingungen konnte eine Resistenz gegen Listeria monozytogenes auch durch Immunisierung mit abgetötetem Toxoplasma-Antigen erreicht werden (40).

Wenn man nun nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine Immunisierung auf intranasalem Wege annimmt, wäre nach diesen Ausführungen auch unspezifischer Krankheitsschutz möglich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Intranasale Anwendung von abgetötetem Toxoplasma-Antigen induziert beim Kaninchen eine Antikörperbildung, die im Sabin-Feldman-Test nachgewiesen werden kann. Sie entspricht in ihrem Verlauf der Immunantwort auf intraperitoneale Injektion von Antigen in gleicher Dosierung und in gleichen zeitlichen Abständen. Nach Beendigung der zweiwöchigen Immunisierung kann es innerhalb von 14 Tagen zu einem Titeranstieg bis 1 : 64, der im Beobachtungszeitraum von 3 Monaten langsam wieder absank.

Das Ergebnis dieser Tierversuche läßt den Rückschluß zu, daß auch der Mensch im epidemischen Falle durch Aufnahme von inaktivierten Toxoplasmen in Schmutz, Lebensmitteln u. a. Antikörpertiter erwerben kann, ohne daß immer eine Infektion mit lebenden Toxoplasmen vorangegangen sein muß.

VI. SCHRIFTTUM

1. BEVERLEY, J., F. ARCHER, W. A. WATSON, A. R. FAWCETT — Trial of a killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to toxoplasmosis
Br.vet.J. 127, 529 1971

2. COLLINS, F. M. — Effect of specific immune mouse serum on the growth of salmonella enteritidis in mice preimmunized with living or ethyl alcohol-killed vaccines
J. Bact. 97, 676 1969

3. CUTCHINS, E. C. J. WARREN — Immunity patterns in the guinea pig following toxoplasma infection and vaccination with killed toxoplasma
Amer. J. trop. Med. 5, 197 1956

4. FAIR, J. R. — Stimulation of dye-test antibodies in human volunteers using heat-killed toxoplasma
Amer. J. Ophthal. 48, 322 1959

5. FOSTER, B. G., W. F. McCULLOCH — Studies on active and passive immunity in animals inoculated with Toxoplasma gondii
Canad. J. Microbiol. 1, 10. 1955

6. FRENKEL, J. K. — Adoptive immunity to intracellular infection
J. Immunol. 98, 1309 1967

7. FUNK, J. — Tierversuche zur oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Fungi (Candida albicans) Med. Inaug. Diss. FU Berlin 1969

8. GILL, H. S., O. PRAKASH — A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis Indian J. med. Res. 58, 1157 1970

9. HAFERKAMP, O. — Einführung in die Immunologie der Infektabwehr Med. Welt 25, 843 1972

10. HAHN, E., AFZELIUS-ALM, L. — Das Verhalten der neutralisierenden und komplementbindenden Antikörper bei der Toxoplasmose Ärztl. Wschr. 12, 953 1957

11. HULDT, G. — Experimental toxoplasmosis Effect of inoculation of toxoplasma in seropositive rabbits Acta path. microbiol. scand. 68, 592 1966

12. HULDT, G. — Experimental toxoplasmosis Effect of cortico-steroids on rabbits with varying degree of immunity Acta path. microbiol. scand. 68, 605 1966

13. HULDT, G. — In vitro studies of some immunological phenomena in experimental rabbit toxoplasmosis Acta path. microbiol. scand. 70, 129 1967

14. HUTCHINSON, W. M. Experimental transmission of Toxoplasma gondii
Nature (Lond.) 206, 961 1965

15. IBRAHIM, H. Versuche über den Immunisierungs-Effekt auf verschiedene Weise applizierter Antigene
Z. Immun.-Forsch. 62, 21 1929

16. JANITSCHKE, K., H. PICHL. G. SEEGER Antikörpertiter nach experimentellen Toxoplasma-Infektionen beim Hauskaninchen
Arzneim. Parasit. 11, 2 1972

17. JIROVEC, O. Resultate des Toxoplasmintestes bei sog. normaler Bevölkerung der Tschechoslowakei
In: H. Kirchhoff, H. Lanner Toxoplasmose, Praktische Fragen und Ergebnisse
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1971

18. KASS, E. Experimental toxoplasmosis
Acta path. microbiol. scand. Suppl. XCIII, 321 1952

19. KASS, E. E. STEEN Serological investigations of rabbits experimentally infected with toxoplasma gondii
Acta path. microbiol. scand. 28, 169 1951

20. KIEß-SAFFMAN, G., E.-M. KURSCHILGEN, A. MARQUARDSEN, H. RAETTIG
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren inneren Antigenen
3. Mitt.: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Infektionen durch Enteritis erregende Salmonellen
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 208, 27 1968

21. KORNILOVA, O. V., S. J. KORNILOVA
Modern concepts on the mechanism of immunity to toxoplasma
3. Intern. Kongr. f. Protozool., Leningrad 1969, 235

22. KOZAR, Z.
Toxoplasmosis and coccidiosis in mammalian hosts
In: F. J. Jackson, N. Herman, I. Singer
Immunity to parasitic animals
Appleton-Century-Crofts, N. Y. 2, 77 - 108

23. KRAHENBUHL, J. L., J. RUSKIN, J. S. REMINGTON
The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: Toxoplasma gondii
J. Immunol. 103, 425 1972

24. KUBLICKA, H., J. KUBLI
Erfahrungen und statistische Betrachtungen über den Serofarbtest nach Sabin und Feldman
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 140, 356 1954

25. NAKAYAMA, J.
On the survival of high virulent strain of Toxoplasma gondii inoculated intravenously into immune mice
Keio J. Med. 15, 13 1966
zit. nach Trop. Dis. Bull. 64, 105, 1967

26. NEAL, R. A., P. C. C. GARNHAM, S. COHEN
Immunization against protozoal diseases
Brit. med. Bull. 25, 19[illegible] 1969

27. OCKLITZ, H. W., M. GRULICH, F. KLIMT
Toxoplasmin reactions in children and juveniles
Scand. J. Infect. Dis. 3, 239 1971

28. PIEKARSKI, G.
Über den gegenwärtigen Stand einiger aktueller Toxoplasmose-Probleme
In: H. Kirchhoff, H. Langer: Toxoplasmose
Praktische Fragen und Ergebnisse
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1971

29. PUHL, U.
Amtsarztarbeit Berlin 1967

30. RAETTIG, H.
Aktuelle Erfolge der oralen Immunisierung
Münch. med. Wschr. 113, 671 1971

31. RAETTIG, H.
Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen
Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert-Koch-Institut
Bundesgesundheitsblatt 14, 141 1971

32. RAETTIG, H. A. BUSE
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
4. Mitt.: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 204, 221 1967

33. RAETTIG, H.
A. BUSE
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
10. Mitt.: Serologische Primär- und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit S. typhi murium-Vollantigen im vergleichenden Tierexperiment
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 216 1970

34. RAETTIG, H.
A. MARQUARDSEN
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
11. Mitt.: Wirksamkeit von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobakteriazeen-Vollantigen im Mäuseschutztest
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215, 296 1970

35. REMINGTON, J. S.
A common mechanism of immunity for intracellular infections
3. Intern. Kongr. Protozool., Leningrad 1969, 241

36. REMKY, H.
Provozierte Titeränderungen des Sabin-Feldman-Tests und ihre Bedeutung für die Diagnose und Therapie der ocularen Toxoplasmose
Klin. Wschr. 42, 279 1964

37. RÜDEL, H.
Untersuchungen über die Möglichkeit der Ausscheidung von Toxoplasmen mit Sekreten und Exkreten von oral mit Toxoplasma-Oozysten infizierten Hunden
Vet.-Med. Inaug. Diss. FU Berlin 1972

38. RUIZ, A.
FRENKEL, J. K.
CERDAS, L.
Isolation of Toxoplasma from soil
J. Parasitol. 59, 204 1973

39. ROTH, W.
W. FRITZ
Über das Vorkommen von Toxoplasma in der Schweiz und die Spezifität des Neutralisationstests
Schweiz. Z. Path. 13, 624 1950

40. RUSKIN, J.
J. S. REMINGTON
Resistance to intracellular infection in mice immunized with Toxoplasma vaccine and adjuvant
J. reticuloendoth. Soc. 9, 465 1971

41. SCHMUDDE, R.
Vergleichende orale, nasale und rektale Impfung von Mäusen mit inaktivierten S. typhi murium-Bakterien mit und ohne Dimethylsulfoxyd-Zugabe
Med. Inaug. Diss. FU Berlin 1968

42. STRANNEGARD, Ö.
The formation of toxoplasma antibodies in rabbits
Acta path. microbiol. scand. 71, 439 1967

43. VOLLBRECHTSHAUSEN, R.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der aktiven Immunisierung bei Toxoplasmose
Z. Tropenmed. Parasit. 6, 169 1955

44. WERNER, H. — Spontane Toxoplasma-Infektion beim Hauskaninchen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 250 1966

45. WERNER, H. I. JANITSCHKE — Vergleichende Untersuchungen an zystenbildenden Toxoplasmen-Stämmen I. Mitt.: Über das Verhalten sog. schwach oder sog. avirulenter Toxoplasmastämme nach intraperitonealer und oraler Inokulation. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 203, 3[illegible] 19[illegible]

46. WERNER, H. K. JANITSCHKE — Aktuelle Probleme der Toxoplasmose. Landarzt 48, 374 1972

47. VAN WESTENRIJK, J. — Untersuchungen über Immunisierung gegen Tuberkulose durch Inhalation von abgetöteten Tuberkelbacillen. I. Mitt. Beitr. Klin. Tuberk. 83, 315 1933

48. WILDFÜHR, G. — Tierexperimentelle Immunitätsversuche mit Toxoplasma gondii. Z. Immun.-Forsch. 113, 435 1957

49. WOLF, A. D. COWEN . H. PAIGE — Human toxoplasmosis (Occurrence in infants as an encephalomyelitis. Verification by transmission to animals) Science 89, 226 1939

50. — Zur einheitlichen Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasmose. Bundesgesundheitsblatt Nr. 23, 343 1966

Herrn Prof. Dr. H. Kaeffle danke ich für die Überlassung des Themas.

Außerdem danke ich ihm und Prof. Dr. H. Werner für freundliche Beratung und viele Anregungen, sowie allen Mitarbeitern der Laboratoriumsgruppe für medizinische Parasitologie für ihre Unterstützung.

LEBENSLAUF

Am 20. März 1948 wurde ich als Tochter des Architekten Walther Schulte und seiner Ehefrau Dr. med. Else-Marie Schulte, geb. Marxsen, in Berlin geboren.

Nach sechsjähriger Grundschulzeit besuchte ich sieben Jahre ein altsprachliches Gymnasium. Dort legte ich im Februar 1967 das Abitur ab.

Vom Sommersemester 1967 bis zum Wintersemester 1972/73 studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin und bestand das Staatsexamen am 13. 3. 1973.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin tätig.